Untersuchungen zum Rückstandsverhalten von Trichlorphon im tierischen Organismus

LEONHARDT SCHENCK

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546005_0009

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dissertationsdruck F. Frank, 8 München 13 Zieblandstr. 39 Tel. 597 397

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Zipf

UNTERSUCHUNGEN ZUM RÜCKSTANDSVERHALTEN VON TRICHLORPHON IM TIERISCHEN ORGANISMUS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Leonhardt Schenck

aus Potsdam

1967

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. A. Herrlich

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Zipf

Tag der mündlichen Prüfung: 27.2.1967

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	DIE ALKYLPHOSPHATE TRICHLORPHON UND DICHLORPHOS	2
2.1.	Chemie und Reaktivität	2
2.1.1.	Trichlorphon	2
2.1.2.	Dichlorphos, DDVP	3
2.2.	Biologische Wirkung	5
2.2.1.	Biologische Wirkung der Alkylphosphate ..	5
2.2.2.	Biologische Wirkung von Trichlorphon und Dichlorphos	7
2.3.	Untersuchungen zum Stoffwechsel und Rückstandsverhalten von Trichlorphon und Dichlorphos	9
3.	EXPERIMENTELLER TEIL	17
3.1.	Material und Methodik	17
3.1.1.	Wirkstoffe	17
3.1.2.	Versuchstiere	17
3.1.3.	Muskelfleisch	17
3.1.4.	Wirkstoffapplikation	17
3.1.4.1.	Perorale Giftverabreichung	17
3.1.4.2.	Pulmonale Giftzufuhr	17
3.1.4.3.	Kontaminierung von Muskelfleisch	18
3.1.5.	Nachweis von Alkylphosphat mittels enzymatischer Methode	18

		Seite
3.1.5.1.	Prinzip des Alkylphosphatnachweises	18
3.1.5.2.	Prinzip der Enzymaktivitätsbestimmung .	18
3.1.5.3.	Herstellung des Teststreifens	19
3.1.5.4.	Gewinnung des Esterasepräparates	19
3.1.5.5.	Durchführung der Bestimmung	2o
3.1.5.6.	Versuche zur Fleischdekontaminierung .	2o
3.1.5.7.	Anhang: Bestimmung der Flüchtigkeit von Armin	21
3.2.	Versuchsergebnisse	22
3.2.1.	Eichkurve für Trichlorphon	22
3.2.2.	Eichwerte für Dichlorphos	23
3.2.3.	Einfluß der Inkubationszeit	24
3.2.4.	Rückstände von Trichlorphon und Dichlorphos in der Muskulatur	25
3.2.5.	Untersuchungen zur Fleischdekontaminierung	25
4.	DISKUSSION	26
4.1.	Der biologische Nachweis von Alkylphosphaten	26
4.2.	Stoffwechsel und Rückstandsverhalten von Trichlorphon und Dichlorphos	30
4.2.1.	Stoffwechsel	30
4.2.2.	Rückstandsverhalten	37
4.3.	Notwendigkeit, Möglichkeiten und Verfahren zur Dekontaminierung Trichlorphon-haltigen Fleisches	41
4.4.	Die fleischbeschauliche Beurteilung des Tierkörpers nach Trichlorphonvergiftung ...	47
ZUSAMMENFASSUNG		48
LITERATURVERZEICHNIS		49
LEBENSLAUF		

1. EINLEITUNG

Die Alkylphosphate Trichlorphon und Dichlorphos sind seit einigen Jahren als Pflanzenschutzmittel und als antiparasitäre Wirkstoffe in der Veterinärmedizin eingeführt. Trichlorphon ist als Dipterex(R) im Pflanzenschutz und als Neguvon(R) in der Veterinärmedizin zur Bekämpfung der Dasselfliegenlarve bekannt geworden. Dichlorphos ist besonders wirksam als Insektizid und erscheint neuerdings in Präparaten gegen Endoparasiten des Schweines.

Die Tatsache, dass Dichlorphos als Trichlorphonmetabolit (neben anderen) dessen eigentlicher Wirkstoffträger ist, besitzt einmal wissenschaftliches Interesse für den Wirkungsmechanismus und dann Bedeutung für das Rückstandsverhalten dieser Verbindungen im Tierkörper.

Vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage der Genußtauglichkeit des Fleisches Trichlorphon- und Dichlorphosbehandelter Tiere unter besonderer Berücksichtigung von Notschlachtungen. Diskutiert werden Notwendigkeit und Möglichkeiten der Fleischdekontaminierung. Die fleischbeschauliche Situation wird erörtert.

Die Arbeit setzt sich dabei kritisch mit der Brauchbarkeit biologischer Nachweismethoden für Alkylphosphatrückstände in tierischen Organen auseinander.

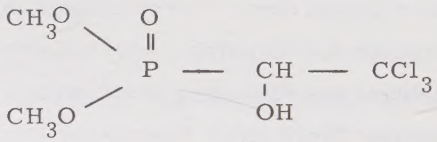
2. Die Alkylphosphate Trichlorphon und Dichlorphos

2.1. Chemie und Reaktivität

2.1.1. Trichlorphon

Trichlorphon wurde im Rahmen der Forschungsarbeiten von SCHRADER und Mitarbeitern (LORENZ et al. 1955) entwickelt. Grundlegende Auskunft über alle Fragen der Chemie der Alkylphosphate erteilt dazu das Standardwerk von SCHRADER (1963).

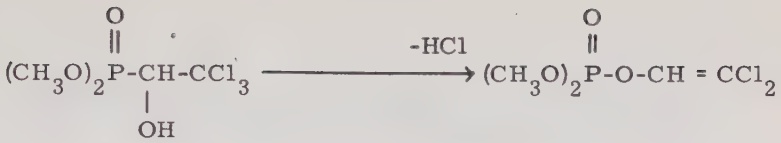
Trichlorphon besitzt die Strukturformel (1) und führt die chemische Bezeichnung O,O-Dimethyl-(1-hydroxy-2,2,2-trichloräthyl)-phosphonat. Die Verbindung ist bimolekular.



(1)

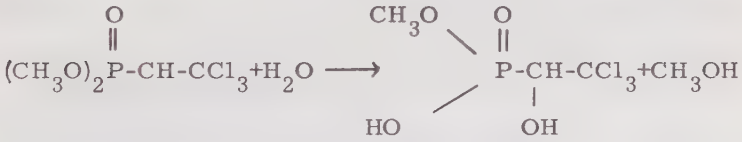
Trichlorphon ist ein weisses, kristallines Pulver, das bei 25°C eine Wasserlöslichkeit von 15,4 g in 100 ml besitzt und in Alkohol, Benzol und den meisten chlorierten Kohlenwasserstoffen löslich ist.

Wäßrige Lösungen werden bei längerem Lagern sauer. Im pH-Bereich über 5,5 geht Trichlorphon langsam in Dichlorphos über (MATTSON et al., 1955). Bei dieser Reaktion wird Chlorwasserstoff abgespalten und das Molekül in Dichlorphos (Dimethyl-dichlor-vinyl-phosphat = DDVP) umgelagert.



Die Reaktivität von Trichlorphon ist dadurch gekennzeichnet, daß es zu den wenigen Alkylphosphaten zählt, die keine Säureanhydridbindung besitzen.

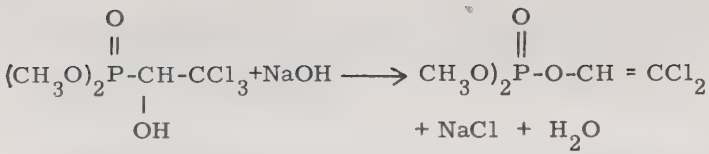
Die Zersetzung von Trichlorphon in Wasser bei saurer Reaktion erfolgt zunächst an einer Methylestergruppe. Erst nach deren Abspaltung sind Chlorionen nachzuweisen.



Bei alkalischer Reaktion erfolgt - entsprechend der fehlenden Säureanhydridbindung - keine Spaltung der P-C-Bindung, sondern unter Abspaltung von Chlorwasserstoff die Umlagerung in Dichlorphos (= DDVP).
Diese Umlagerungsreaktion ist für das Verständnis der biologischen Wirkung der beiden Verbindungen wichtig.

2. 1. 2. Dichlorphos, DDVP

Die zuletzt angeführte Reaktion von Trichlorphon mit Alkalien ergibt eine 58%ige Ausbeute (der Theorie) an Dichlorphos.



Diese Reaktion wird zur technischen Gewinnung von DDVP benützt.

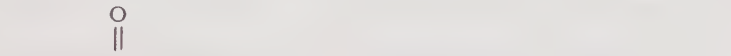
Das Trichlorphon-Umlagerungsprodukt: O,O-Dimethyl-O-(2,2-dichlor-vinyl)-phosphat ist eine farblose, etwa 1%ig wasserlösliche Flüssigkeit, die sich in den meisten organischen Lösungsmitteln gut löst.
Dampfdruck und Flüchtigkeit - zwei für das später erörterte Rückstandsproblem wichtige Eigenschaften - sind beim Dichlorphos wesentlich höher als beim Trichlorphon, worüber die folgende Tabelle (nach SCHRADER 1963) informiert.

	Trichlorphon		Dichlorphos	
T [°C]	p mg/kg	v mg/m^3	p mg/kg	v mg/m^3
10°	-----	----	$4,5 \times 10^{-3}$	56,5
20°	$7,8 \times 10^{-6}$	0,11	$1,2 \times 10^{-2}$	145
30°	28×10^{-6}	0,38	3×10^{-2}	350
40°	111×10^{-6}	1,45	7×10^{-2}	800

Tab. 2.1.: Dampfdruck und Flüchtigkeit von Trichlorphon und Dichlorphos

Die 5o%ige Verseifung von DDVP durch Wasser dauert bei 4o°C etwa 5,8 Tage, bei 7o°C etwa 4 Stunden. Die 5o%ige Verseifung bei pH 7 und 7o°C nimmt etwa 3o Minuten in Anspruch. Im alkalischen Bereich (pH 11) und 28°C beträgt die Halbwertszeit von DDVP ungefähr 12 Minuten.

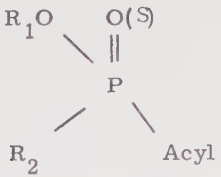
Bei dieser Hydrolyse entstehen als Spaltprodukte Dimethylphosphorsäure und Dichlorvinylalkohol. Der unbeständige Vinylalkohol geht jedoch sofort in Dichloracetataldehyd über.



2. 2. Biologische Wirkung

2. 2.1. Biologische Wirkung der Alkylphosphate

Biologisch aktive Alkylphosphate entsprechen nach SCHRADER der allgemeinen Formel



In der Formel bedeuten R_1 und R_2 = Alkyl-, Alkoxy-, Alkylaminogruppen oder basische Reste und die Acylgruppe einen aciden Rest anorganischer oder organischer Herkunft (z.B. Cl, F, SCN, CNO, CH_3COO^-, Phenolrest u.a.). Die Alkylphosphate sind als gemischte Säureanhydride aufzufassen.

Die biologische Wirkung dieser Verbindungen kommt durch Spaltung der Säureanhydridbindung "P-Acyl" in einer nucleophilen, bimolekularen "displacement"-Reaktion zustande, wobei der (phosphorhaltige) Acylrest auf nucleophile Reaktionspartner des Organismus (Hydrolasen, besonders Cholinesterasen) übertragen wird.

Damit stellt die Reaktion von Alkylphosphaten mit körpereigenen Reagenten (Esterasen) den besonderen Fall einer im Organismus verlaufenden Alkylphosphathydrolyse dar (E in Reaktionsgleichung = Enzym).

$$(R_1O)(R_2)PO\text{-Acyl} + H.E \longrightarrow (R_1O)(R_2)PO.E + H.Acyl$$

Das Enzym wird dabei phosphoryliert und stellt einen Ester dar (kovalente Bindung), der nur schwer (oder gar nicht) mit Wasser zu reagieren vermag. Das Enzym ist damit reversibel (bzw. irreversibel) gehemmt und funktionsunfähig. Folge dieser Enzymblockade ist eine endogene Acetylcholinanhäufung, die zum charakteristischen Bild der kombinierten Muskarin-Nikotinvergiftung mit zentralnervösen Ausfallserscheinungen führt.

Der feinere Mechanismus der Enzymhemmung ist genau erforscht und beschrieben (COHEN u. OOSTERBAAN, 1963): die Phosphorylierung des Enzyms (esteratischer Bindungsort) erfolgt an der Hydroxylgruppe eines Serinrestes im Enzymmolekül. Die reaktive OH-Gruppe ist damit der nucleophile Reaktionspartner in vivo.

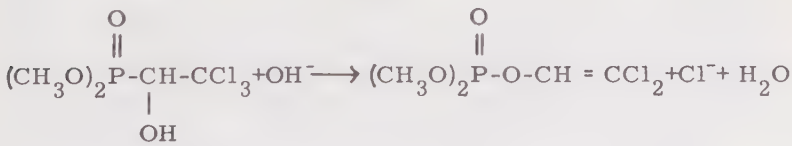
Die Geschwindigkeit der Enzymphosphorylierung wird von der chemischen Struktur des Alkylphosphats bestimmt. Die

Alkylphosphathydrolyse verläuft umso rascher, je elektrophiler die Bindung P=O ausgebildet ist. Die Polarisierung dieser Bindung wird in erster Linie von der Stärke der Säure H-Acyl bestimmt und dann von der Länge der Alkylgruppen im Molekül. Je stärker die bei der Hemmstoffhydrolyse freiwerdende Säure (H-Acyl) ist, desto schneller wird das Molekül gespalten. Fluor-haltige Hemmstoffe (H. Acyl = HF!) sind die wirksamsten Enzyminhibitoren, z. B. Diisopropylfluorphosphat (DFP). Nach PULLMANN u. VALDEMORO (1960) liegt bei den Alkylphosphaten - wie beim natürlichen Substrat Acetylcholin - ein Elektronenmangel im Molekül vor. Die Hemmkraft eines Alkylphosphats hängt von der Affinität des Phosphoratoms zu einem elektronenreichen Zentrum im Enzym ab.

2. 2.2. Biologische Wirkung von Trichlorphon und Dichlorphos

Das Molekül Trichlorphon besitzt keine Säureanhydridstruktur und für seine biologische Wirkung ist - nach heutigem Wissen und mit evtl. Einschränkung für Warmblüter - der oben beschriebene Übergang in Dichlorphos (DDVP) notwendig.

Diese Reaktion verläuft im Organismus unter der Einwirkung reaktionsfähiger Hydroxylgruppen und kann durch die folgende Gleichung beschrieben werden:



Diese im Organismus (vor allem in der Leber) ablaufende Trichlorphonumlagerung in Dichlorphos ist durch die Untersuchungen von HEATH (1961) bestätigt.

Die Tatsache, dass das Hydrolyseprodukt DDVP in vivo kaum oder gar nicht nachweisbar ist, kann nicht als Beweis gegen diese Ansicht verwendet werden.

DDVP ist cholinergisch außerordentlich wirksam (die 5o%ige Hemmung von Rindererythrozyten-Cholinesterase liegt bei $8,24 \times 10^{-7}$ Mol), gelangt aber nach oraler Verabreichung fast ausschließlich in die Leber und wird dort äußerst rasch von A-Esterasen (ALDRIDGE, 1952 a,b) abgebaut (LAWS, 1966):

$$(CH_3O)_2\overset{\overset{O}{\|}}{P}\text{-O-CH} = CCl_2\text{-}OH^- \longrightarrow (CH_3O)_2PO.OH + (CHCl_2.CO)^-$$

Daneben ist ein Abbau durch Abspaltung von Alkylgruppen möglich. Dieser schnelle Abbau erklärt die Tatsache, daß die Toxizität von DDVP trotz hoher (in vitro) Enzymwirksamkeit unter der von Parathion liegt.

Vergleichbare Toxizitätswerte dazu sind in der nächsten Tabelle zusammengestellt (nach GAINES, 196o).

Tierart	Applikation	Trichlorphon	DDVP	Parathion
Ratte	oral	63o	8o	13
Ratte	oral	56o	56	3,6
Ratte	cutan	2ooo	1o7	21
Ratte	cutan	2ooo	75	6,8

Tab. 2.2.: Toxizität von Trichlorphon, Dichlorphos und Parathion bei der Ratte. Werte = LD_{5o} in mg/kg.

Die für Trichlorphon angegebenen Toxizitätswerte sind nach HEATH (1961) in dem Sinne zu interpretieren, wonach von der verabreichten Dosis nur ein geringer Teil zum DDVP umgelagert zu werden braucht, um wirksam zu sein. Von einer verabreichten LD_{50} von Trichlorphon sind beim Wirkungseintritt erst die Anteile verbraucht, die einer wirkungsgleichen Dosis von Dichlorphos entsprechen. Die Differenz beider Dosen zeigt (theoretisch) einen Trichlorphonrückstand (im Wirkungszeitpunkt) an, der jedoch praktisch wegen gleichzeitig weiterlaufenderStoffwechselvorgänge nicht in Erscheinung tritt (letale Dosen ausgenommen).

Hinsichtlich der biologischen Wirkung von Trichlorphon hat SCHRADER (1963) auf die Tatsache aufmerksam gemacht, daß dieser Wirkstoff ein starkes Methylierungsmittel ist. Damit könnte eine evtl. Alkylierung lebenswichtiger Enzyme mit der gleichlaufenden Phosphorylierung von Cholinesterasen und den damit auftretenden Stoffwechselstörungen das oft beschriebene Wirkungsbild zeitigen. Untersuchungen in dieser Richtung (s.a. HILGETAG u. TEICHMANN, 1965) sind noch nicht abgeschlossen.

2. 3. Untersuchungen zum Stoffwechsel und Rückstandsverhalten von Trichlorphon und Dichlorphos

Den Stoffwechsel von Dipterex(R) bei Ratten, Meerschweinchen und Mäusen untersuchten DU BOIS und COTTER (1955). Eine tägliche Zufuhr von 50 mg/kg an Ratten wurde von den Tieren 60 Tage lang vertragen. Aus Serumbestimmungen wurde ermittelt, daß das Serum 12 Stunden nach einer Dosis von 150 mg/kg kein freies Dipterex mehr enthält. Leberanalysen erbrachten ein ähnliches Ergebnis: 15 Minuten nach Applikation von 75 mg/kg wurde kein nachweisbarer Betrag der Verbindung

in diesem Organ gefunden. Mit dem Urin werden 1-3% verabreichter Dosen während der ersten 24 Stunden unverändert ausgeschieden. In der folgenden Periode ist keine meßbare Menge mehr zu bestimmen. Dieser Befund wurde auch bei 21 Tage dauernder Verfütterung von loo mg/kg/Tag erhoben: nur 3% Dipterex wurden unverändert ausgeschieden. Nach Dosen bis zu 15o mg/kg wurde ein Absinken der Cholinesterase-Aktivität auf 17% des Normalwertes gemessen, wobei das Maximum der Hemmung (im Gehirn) bereits nach 15 Minuten eintrat. 5 Stunden nach Applikation war eine 8o%ige Aktivität der Gehirn-Cholinesterase wieder erreicht. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß Dipterex rasch metabolisiert und in Form inaktiver Verbindungen ausgeschieden wird.

An einem Rind wurde von BOLLE (1956) ein Toxizitätsversuch mit ^{32}P-markiertem Neguvon$^{(R)}$ durchgeführt. Nach Verabreichung von loo mg/kg wurden Harn, Blut, Milch, Faeces und Haut untersucht. Nach 3 Stunden sind mit dem Harn 28% der gesamten verabreichten ^{32}P-Menge ausgeschieden. Nach 45 Stunden waren darin nur noch o,28% (d.i. der loo. Teil des 3-Stunden-Wertes) nachweisbar. In der Milch lag der Höhepunkt der Ausscheidung nach 9 Stunden bei 13,1 mg/l (o,o5%): der Wert sank nach 45 Stunden auf 6,2 mg/l (o,o2%) ab. Im Blut waren nach 3 Stunden 32,6 mg/kg enthalten (o,13%); nach 12 Stunden 6,5 mg/kg (o,o3%) und nach 45 Stunden noch o,7 mg/kg (o,oo3%) nachweisbar. Die Meßwerte beziehen sich auf ^{32}P.

Die Untersuchungen von ROBBINS, HOPKINS und EDDY (1956) ergänzen diese Befunde. Eine Kuh erhielt oral 25 mg/kg ^{32}P-Dipterex (Bayer L13/59). Bezüglich Stoffwechsel und

Ausscheidung wurden folgende Werte gefunden: Der Höchstwert der Blutradioaktivität (in ^{32}P-Äquivalenten) wurde in der 2 Stunden-Probe mit 15 µg/ml gemessen; davon waren 7,5% unverändertes Material. Innerhalb von 144 Stunden wurden weniger als o,2% der gesamten Radioaktivität über die Milch ausgeschieden. Davon waren nur Spuren unverändertes Material und etwa 25% Orthophosphat. Zwischen 6 und 48 Stunden erschienen im Chloroformextrakt weniger als 1o% der Radioaktivität als Dipterex. Chromatographisch analysierte Extrakte brachten nur Spuren an Radioaktivität mit einem R_f-Wert von Dipterex. Der Wirkstoff wird von der Kuh rasch metabolisiert und mit dem Urin ausgeschieden. Mit einer Konzentration von 1,4 mg-Äquivalenten/ml Urin lag der Ausscheidungshöchstwert zwischen 2 1/2 und 5 1/2 Stunden. In den ersten 12 Stunden wurden 66% der verabreichten Dosis mit dem Urin ausgeschieden; davon betrug der Anteil von unverändertem Dipterex (gemessen als ^{32}P) nur o,26%. Von den Urinmetaboliten betrug der Anteil der Hydrogenphosphate etwa 17%. Der Rest von 76% waren nicht weiter bekannte Stoffwechselprodukte. Weniger als 3% der verabreichten Dosis wurden in den Faeces bestimmt. Die Werte zeigen, dass die Spaltung der P-C-Bindung demnach nicht der Hauptabbauweg von Dipterex bei der Kuh sein dürfte. Weder in Blut, Milch noch Urin war DDVP nachzuweisen.

ARTHUR und CASIDA (1957) injizierten einem 9,2 kg schweren Hund (weibl.) 15o mg/kg markiertes Trichlorphon intravenös. Die ersten cholinergen Symptome traten 15 Minuten nach Applikation auf, nahmen nach 3o Minuten wieder ab und waren nach 6 Stunden vollständig verschwunden. Die 1o Minuten-Blutprobe enthielt 1 Teil Trichlorphon auf 2 Teile Hydrolysenprodukte, nach 6 Stunden waren nur noch o,4% der verabreich-

ten Dosis als ungespaltenes Phosphat vorhanden und etwa 4-mal so viel P-haltige Spaltprodukte. Urin, Faeces und Speichelproben waren in den ersten Stunden nach Applikation hoch radioaktiv. Innerhalb von 2 Tagen waren weniger als 1% Trichlorphon unverändert ausgeschieden worden. Als Hauptabbauprodukt im Urin wurde Trichloräthyl-glucuronid (63%) gefunden. Trichloräthanol ist nach diesen Befunden beim Hund das Hauptabbauprodukt von Trichlorphon. Dichlorphos war in keiner Organprobe nachweisbar.

Der Wirkstoffgehalt in Schaf- und Rindfleisch zu verschiedenen Zeiten nach der Neguvon(R)-Behandlung wurde von BEHRENZ (1959) biologisch (Fliegentest) bestimmt. Der benutzte Test besitzt eine Empfindlichkeit von o,1 ppm Wirkstoff. Im Fleisch von Schafen, die 12o mg/kg erhalten hatten, wurde 1 Stunde nach Verabreichung eine loo% Larvensterblichkeit beobachtet, sofern die Larven 3 Stunden lang dem Fleisch und eine Stunde lang den Tieren aufgesetzt waren. Leberproben waren negativ. Bei Schlachtung 6 Stunden nach Applikation wurde in einem Fall weder durch Fleisch noch durch Organe eine Larvensterblichkeit (Testzeit bis 23 Stunden) verzeichnet; bei einem 2. Fall eine 5o%ige Sterblichkeit in der Rückenmuskulatur 17 Stunden nach dem Aufsetzen. Bei Rindern (loo mg/kg) wurden ähnliche Werte bestimmt. Der Höchstwert ist ebenfalls nach einer Stunde erreicht. Nach 2 Stunden ist der Neguvon-Spiegel auf 1 mg/kg abgesunken. 4 Stunden nach Behandlung war das Fleisch praktisch wirkstoffrei. Nach 6 Stunden war keine Spur mehr nachzuweisen. Praktisch die gesamte Resorption und Exkretion von Neguvon, bzw. seine Umwandlung in nicht mehr auf Fliegenlarven wirksame Verbindungen erfolgt bei Schafen und Rin-

dern in den ersten 4-6 auf die Behandlung folgenden Stunden. Danach sinkt der Wirkstoffgehalt auf biologisch nicht mehr meßbare Konzentrationen (unter o, 1 ppm) ab.

THAMM (196o) untersuchte die pathologisch-anatomischen und -histologischen Gewebsveränderungen nach Verabreichung eines 75% Trichlorphon enthaltenden Präparates (Emittol(R)) an Bullen, Färsen und Milchkühe und erhob die folgenden Befunde: Lungenödem, Herzmuskeldegeneration, toxische Leberdystrohpie, Glomerulo- und interstitielle Nephritis, haemorrhagische Infarzierung sowie eine Degeneration der Markzellen der Nebennieren, interfollikuläre Adenomatose der Schilddrüse und degenerative Schädigung des Keimepithels. Dazu bei massiven Vergiftungen Veränderungen im Magen und Duodenum.

Die Milch behandelter Tiere war in der Lage, bei Versuchstieren folgende Symptome hervorzurufen: Toxische Leberdystrohpie, Glomerulo- und interstitielle Nephritis, Darmentzündung (Verminderung der normalen Darmflora, Sterilisation des Kotes), Herzmuskeldegeneration, destruktive Veränderungen im Nebennierenmark. Die Schädigung des Wirtstierorganismus führte zu einer erhöhten Infektionsbereitschaft.

THAMM folgert aus seinen Untersuchungen, daß die Ausscheidung toxischer Stoffe mit der Milch nach Anwendung therapeutischer Dosen von Phosphonsäureestern 8-1o Tage lang anhält.

Zu wesentlich anderen Ergebnissen kommt BEHRENZ (196la) bei Untersuchungen zur Ausscheidung von Neguvon(R) mit der Milch. Der Wirkstoff wurde dabei im Ganzsprühverfahren,

Rückenwaschverfahren und peroral beigebracht; der Nachweis erfolgt im Biotest (mit Larven von Aedes aegypti) mit einer Nachweisempfindlichkeit bis zu o,o5 ppm. Gemessen an den Neguvon-Mengen, die im Fleisch nach peroraler Behandlung kurzzeitig nachweisbar sind, tritt nur sehr wenig Wirkstoff in die Milch über. Bei 12 mit praxisüblichen Anwendungsverfahren behandelten Milchkühen schwankten die im 1.Gemelk gefundenen Wirkstoffmengen zwischen o ,o5 und 2,5 ppm; vom 2. Gemelk an war die Milch praktisch wieder wirkstoffrei. (s. dazu auch LEAHY, 1964).

Mit dem Nachweis von Neguvon in Eiern befasste sich BEHRENZ (1961 b), der im Biotest für das Eiklar eine Nachweisempfindlichkeit von o,1 ppm, für das Eigelb von 1 ppm Wirkstoff ermittelte. Bei äußerlich mit o,3%iger Lösung und peroral mit lo mg/kg Neguvon behandelten Leghühnern konnte innerhalb der nachweisbaren Grenzen eine Aufnahme von Wirkstoff in die Eier der behandelten Tiere nicht festgestellt werden.

Mit dem (enzymatischen) Abbau von ^{32}P-Dichlorphos befaßt sich eine Arbeit von HODGSON und CASIDA (1962). Die hydrolytische Spaltung von DDVP (durch Homogenate von Leber, Nieren und Milz von Ratten und Kaninchen) findet vornehmlich zu 5o-8o% an der P-O-vinyl-Gruppe statt und ergibt Dimethylphosphat und Dichloracetaldehyd. Daneben verläuft eine Abspaltung einer oder beider Alkylgruppen aus dem Molekül, die über Desmethyl-DDVP zum Orthophosphat führt.

Den Ausscheidungsmechanismus von ^{32}P-markiertem Trichlorphon (im Präparat Bubulin$^{(R)}$) nach intravenöser und intramuskulärer Applikation an Rinder (unter Atropin und PAM-Schutz)

untersuchten KÜHNERT, DEDEK und SCHWARZ (1963). 1 Stunde nach i.v. Verabreichung von 2o mg/kg sind im Blut mehr als 95% der Dosis zu nicht toxischen Spaltprodukten abgebaut. Dichlorphos ist nur innerhalb der ersten 4 Minuten nach Injektion nachweisbar. Die Milch enthält nach 6 Stunden keine radioaktiven Substanzen mehr, der Urin nur ungiftige Abbauprodukte, die Faeces Spuren an Wirkstoff. Nach i.m. Injektion ist Wirkstoff - infolge der Resorptionsverzögerung - bis zu 6 Stunden nachzuweisen. Milch enthält Spuren Trichlorphon bis zu lo Stunden nach der Verabreichung, jedoch kein DDVP. Die Leberzellen wiesen keine histopathologischen Veränderungen auf. Gegenüber dem Abbau im wäßrigen System wird DDVP im Blut lo mal schneller abgebaut.

KEDENBURG (1965) findet nach äusserlicher Anwendung ("pour on"-Verfahren) von Neguvon(R) bei Rindern (bis 36 mg/kg) 8 Stunden nach dem Aufgießen eine Ausscheidung von 8 mg/l Milch. Die Wirkstoffausscheidung sank 6o Stunden nach Behandlung unter die Nachweisgrenze ab. In Fleisch und Organen (Leber, Nieren, Nierenfett, Unterhautfett) sind 21 Tage nach dem Aufgießen von Neguvon keine Wirkstoffspuren nachweisbar.

Stoffwechseluntersuchungen von HASSAN und Mitarbeitern (1965a) mit ^{32}P-markierten Dipterex am Rattenhirn ergaben, daß 4 Metaboliten auftreten, von denen 3 Säurecharakter zukommt. Von den Metaboliten entfallen 37% auf einfach demethyliertes Dipterex, 7% auf Monomethylphosphat, 16% auf 2,2,2-Trichlor-1-hydroxyäthylphosphat und 4o% auf nicht identifizierte Produkte. Verfasser vermuten, daß Dipterex von Acetylcholinesterase bimolekular angegriffen und ebenso

wie in anderen Geweben auch im Säugetierhirn schnell abgebaut und damit entgiftet wird.

HASSAN und ZAYED (1965 b) zeigten ferner mit in den Methylgruppen ^{14}C-markiertem Dipterex, daß über 60% der Aktivität im Verlauf von 24 Stunden in der Ausatemluft und im Urin erscheinen, hauptsächlich als CO_2 in der Atemluft und als Ameisensäure und Dimethylphosphat im Urin.

Neueste Untersuchungen von LAWS (1966) zur Resorption von DDVP nach oraler Applikation an Ratten stützen die Annahme, daß der Wirkstoff hauptsächlich, wenn nicht ausschließlich vom Leberkreislauf aufgenommen und in der Leber entgiftet wird, bevor er in den Körperkreislauf gelangt.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Material und Methodik

3.1.1. Wirkstoffe

Die Wirkstoffe Dichlorphos und Trichlorphon standen als Reinsubstanzen zur Verfügung[x]. Von Dichlorphos wurde eine 1%ige, von Trichlorphon eine 12% Stammlösung mit Aqua dest. hergestellt. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank (+ 4°C) waren die Stammlösungen mehrere Wochen lang ohne Wirkstoffverlust haltbar. Die Endverdünnung erfolgte unmittelbar vor den Versuchen mit Aqua dest.

3.1.2. Versuchstiere

Als Tiermaterial wurden 150-400 g schwere Ratten (männliche und weibliche Tiere) eines institutseigenen Stammes verwendet.

3.1.3. Muskelfleisch

Für die Dekontaminierungsversuche wurde Fleisch vom Städtischen Schlachthof München zur Verfügung gestellt.

3.1.4. Wirkstoffapplikation

3.1.4.1. Perorale Giftverabreichung

Die Wirkstofflösungen wurden mit der Magensonde verabreicht.

3.1.4.2. Pulmonale Giftzufuhr

Die Giftlösung wurde in einem Rundkolben im Wasserbad auf 70°C erhitzt und die Dämpfe im geschlossenen System

---

[x] Für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen möchten wir Herrn Dr. SCHRADER, Farbenfabriken Bayer, Werk Wuppertal, an dieser Stelle verbindlichst danken.

mit der Atemluft durch den angeschlossenen Tierbehälter (Röhre mit Durchmesser von etwa 8 cm) geleitet. Die Tiere blieben bis zum Todeseintritt der gifthaltigen Luft ausgesetzt. Die Temperatur im Tierbehälter betrug 35°C.

3.1.4.3. Kontaminierung von Muskelfleisch

Unterschiedlich grosse Fleischstücke (bis zu 1,5 kg) wurden verschieden lange Zeiten (bis 48 Stunden) in wäßrige Wirkstofflösungen (bei +4°C) eingelegt.

3.1.5. Nachweis von Alkylphosphat mittels enzymatischer Methode

3.1.5.1. Prinzip des Alkylphosphatnachweises

Die auf Alkylphosphat hin zu untersuchende Probe (aliquoter Teil) wird mit einem Esterasepräparat bekannter Aktivität inkubiert. Die im Inkubationsansatz ermittelte Aktivität (pro Zeiteinheit) wird an einer Eichkurve direkt als Giftkonzentration abgelesen. Die Eichkurve wird durch Aktivitätsbestimmung von Ansätzen mit bekannten Giftmengen aufgestellt. Bezugswert für die Ansätze ist die in einer Leerprobe (Giftkonzentration = O) ermittelte Aktivität des Enzympräparats ("Normalzeit" des Tests).

3.1.5.2. Prinzip der Enzymaktivitätsbestimmung

Butyrylthiocholin (als Substrat) wird durch Pferdeserum-Esterase in Buttersäure und Thiocholin gespalten. Der im Inkubationsansatz durch die frei werdende Buttersäure ein-

tretende pH-Abfall wird mit Hilfe eines geeigneten Indikators (Bromthymolblau oder Phenolrot) angezeigt.

Eine hohe Esteraseaktivität (=ungehemmtes Enzym) ergibt eine rasche pH-Verschiebung; bei geringer Enzymaktivität (= gehemmte Esterase) erfolgt ein langsamer, bzw. kein pH-Abfall. Die Enzymaktivitätsbestimmung wird mittels eines Teststreifens durchgeführt.

3.1.5.3. Herstellung eines Teststreifens

Papierbogen für chromatographische Zwecke (Schleicher und Schüll Nr. 2o43 b) wurden in 1 cm lange Streifen geschnitten und in eine Lösung folgender Zusammensetzung getaucht:

Butyrylthiocholinjodid	1,7 g
Bromthymolblau (oder Phenolrot)	o,3 g
Äthanol	ad loo,o ml

Nach Trocknung in der Luft oder auf Glasplatten wurden die Streifen in $1cm^2$ große Stücke geschnitten und in braunen Glasflaschen aufbewahrt.

3.1.5.4. Gewinnung des Esterasepräparates

Frisch gewonnenes Pferdeblut (Kliniken der Tierärztlichen Fakultät) mit $1^{o}/oo$ Heparinzusatz wurde bei 2ooo Umdrehungen/min lo min lang zentrifugiert und das überstehende Serum gesammelt. Das Serum wurde bei $+4^{o}C$ aufbewahrt

und zeigte dabei über mehrere Wochen hin keinen merklichen Aktivitätsverlust. Durch Tiefkühlung auf -22°C ließ sich die Verwendungsfähigkeit um mehrere Monate verlängern.

3.1.5.5. Durchführung der Bestimmung

Die zu untersuchende Muskel- bzw. Organprobe wurde mit 3 Teilen Aq.dest. homogenisiert (Ultra-Turax der Firma Deuta). O,1 ml dieses Homogenats (oder stärkere Verdünnungen) wurden mit 1,o ml Serum bei 21° bzw. 37°C 3o min lang inkubiert und o,o25 ml dieses Ansatzes mit der Blutzuckerpipette auf einen Objektträger aufgetragen. Auf den Tropfen wurde ein Testpapierstück gelegt und das vollgesogene Papier sofort mit einem zweiten Objektträger abgedeckt. Die vom Durchtränken des Testpapieres an bis zum Auftreten des charakteristischen Farbumschlags (Bromthymolblau: blaugrün nach gelb; Phenolrot: violett nach orange) verstrichene Zeit wurde mit der Stoppuhr bestimmt.

Bei Leerproben wurden o,1 ml Aq.dest mit 1,o ml Serum inkubiert und die Zeit bis zum Erreichen des Farbumschlags gemessen ("Normalzeit" je nach Serumaktivität zwischen o,5 und 2 min). Alle Untersuchungen wurden bei Zimmertemperatur (21°C) durchgeführt.

3.1.5.6. Versuche zur Fleischdekontaminierung

Die Möglichkeit, Fleisch durch Erhitzen bzw. Kochen zu dekontaminieren wurde mittels einer einfachen Destillationsapparatur (Liebig-Kühler, 4o cm Kühlmantel) ge-

prüft. Mit Trichlorphon versetztes Muskelfleisch, bzw. Muskelfleisch vergifteter Ratten wurde in einem Kolben mit Wasser gekocht und das übertretende Destillat 1 1/2 Stunden lang fraktioniert gewonnen. Destillat und Kochgut wurden auf enzymhemmenden Wirkstoff hin untersucht.

Dasselbe Untersuchungsmaterial wurde im offenen System (Kochkolben) gekocht und das Kochgut nach 15, 3o und 6o min auf freien Wirkstoff hin untersucht.

3.1.5.7. Anhang: Bestimmung der Flüchtigkeit von Armin

Vorbemerkung:
Der zum Paraoxon analoge Phosphorsäure-Ester ist unter der Bezeichnung "Armin" (SCHRADER 1963) in der Literatur beschrieben. Armin ist chemisch: Äthyl-phosphorsäure-O- äthyl-O-p-nitrophenolester. Der Wirkstoff ist wegen seiner hohen Toxizität nicht im Pflanzenschutz eingeführt; er findet in der Glaukombehandlung und in der Geburtshilfe Anwendung.

Armin ist durch seine hydrolytische Beständigkeit ausgezeichnet: wäßrige Lösungen können jahrelang aufbewahrt, sowie bei loo ^{o}C ohne wesentlichen Wirkstoffverlust sterilisiert werden.

Um einen Wert für die Flüchtigkeit von Armin zu erhalten, wurde folgende Methode verwendet:

Flüchtigkeit:
Armin wurde in einen beheizten Kolben gegeben, dessen Luftraum durch ein doppelt verschlossenes (2 Sperrhähne) Rohr zugänglich ist. Mit einer Injektionsspritze wurde Armin-haltige Luft aus dem Kolben gesogen, die (verschlossene) Spritze mit Wasser gefüllt und nach Abkühlen auf +4 ^{o}C kräftig geschüttelt. Der Wirkstoffgehalt wurde mittels der oben beschriebenen Anordnung bestimmt.
Ergebnis: bei +79 ^{o}C wurde eine Arminkonzentration von o,o33 mg/m ^{3} Luft gemessen.

3.2. Versuchsergebnisse

3.2.1. Eichkurve für Trichlorphon

Die Abhängigkeit der Testzeit von der Wirkstoffkonzentration ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Die Werte sind aus 24 Doppelbestimmungen ermitteli.

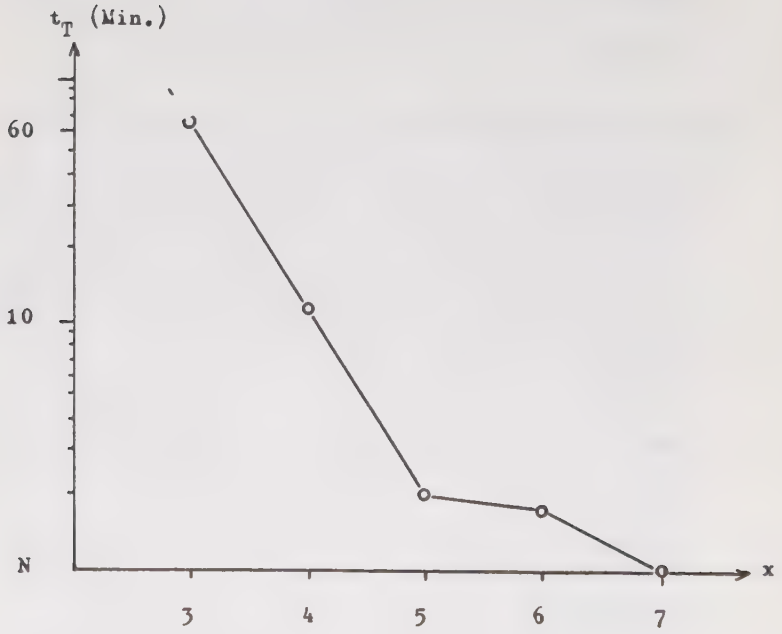


Abb. 3.1: Abhängigkeit der Testzeit von der Trichlorphon-Konzentration bei 3o-minütiger Inkubation.
Abszisse: negativer Logarithmus der Trichlorphon-Konzentration (x), Faktor 1,2).
Ordinate: Testzeit in Minuten (t_T).

Die Empfindlichkeit der Methode erfasst damit den Bereich zwischen o,1 und 1 ppm. Eine lo-fach verlängerte Normalzeit zeigt eine Wirkstoffkonzentration von etwa loo ppm an. Die obere Empfindlichkeitsgrenze liegt bei 5oo ppm. Höhere Mengen sind nicht mehr mit Sicherheit anzugeben, da nach 6o min Testzeit der Teststreifen auszutrocknen beginnt.

3.2.2. Eichwerte für Dichlorphos

Die Abhängigkeit der Testzeit von der Dichlorphoskonzentration bei zwei verschiedenen Inkubationszeiten ist in Tabelle 3.1. wiedergegeben.

Dichlorphoskonzentration: $1,4 \times lo^{-n}$

	2	3	4	5	6	7
5	---	---	---	3o	2	"normal"
9o	---	---	15	12	2,75	1,75

Tab. 3.1: Abhängigkeit der Testzeit von der Dichlorphos-Konzentration bei Inkubationszeit (t_1) von 5 bzw. 9o Minuten;

n = Logarithmus der Wirkstoffkonzentration.

(-) = keine meßbare Testzeit.

Die untere Nachweisgrenze für Dichlorphos liegt damit (wie die von Trichlorphon) im Bereich von o,1 ppm. Die Inkubationstemperatur hat keinen Einfluß auf die Testzeitwerte.

3.2.3. Einfluß der Inkubationszeit

Die Beziehung zwischen der Inkubationszeit (Untersuchungsgut/Esterasepräparat) und der Testzeit zeigt Abbildung 3.2.

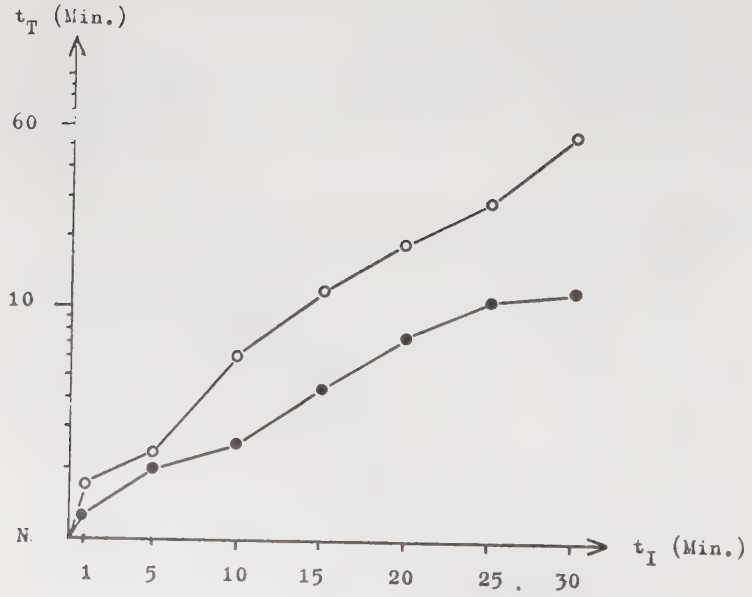


Abb. 3.2.: Abhängigkeit der Testzeit von der Inkubationsdauer des Ansatzes Probe/Enzympräparat.

Abszisse: Inkubationszeit in Minuten (t_I)
Ordinate: Testzeit in Minuten (t_T)

Trichlorphonkonzentration: $1,2 \times 10^{-4}$ g/ml (=100 ppm)
Inkubation bei 21°C (volle Kreise) und 37°C (helle Kreise)

3.2.4. Rückstände von Trichlorphon und Dichlorphos in der Muskulatur

In der Muskulatur (Vorder-, Hintergliedmaße und Rumpf) von Ratten, die mit der dreifachen LD_{50} von Trichlorphon vergiftet wurden (und daran innerhalb von 10 bis 25 min nach Applikation verendeten) war ein Trichlorphonrückstand von 400 ppm nachzuweisen. Der Wert resultiert aus Untersuchungen im Zeitabstand von 2 Stunden nach Todeseintritt. Die Inkubationsdauer betrug dabei stets 30 Minuten.

In den entsprechenden Parallelversuchen mit Dichlorphos (ebenfalls dreifache LD_{50} bzw. pulmonale Giftapplikation bis zum Tode) verendeten die Tiere regelmässig nach 3 Minuten 40 Sekunden, bzw. innerhalb weniger Minuten. Der Rückstand in der Muskulatur lag an der unteren Nachweisgrenze im Bereich zwischen 0,1 und 1 ppm). Den Werten liegen Untersuchungen von je 40 Tieren pro Wirkstoff zugrunde.

3.2.5. Untersuchungen zur Fleischdekontaminierung

Nach 1 1/2 stündigem Kochen in der Destillationsapparatur wie nach 1-stündigem offenen Kochen war das Untersuchungsgut frei von enzymhemmenden Wirkstoff. In der Vorlage war das Destillat nach 1 Stunde noch gifthaltig, nach 1 1/2 Stunden jedoch frei von Wirkstoff.

4. DISKUSSION

4.1. Der biologische Nachweis von Alkylphosphaten

Für die in vorliegender Arbeit gewählte biologische, bzw. enzymatische Bestimmungsmethode für Alkylphosphate sind drei Gründe anzugeben:

(i) die besondere Eignung zur Erfassung von Wirkstoffrückständen, (ii) die Empfindlichkeit und (iii) die methodische Einfachheit des Nachweises.

Die Erfassung von Alkylphosphatrückständen im unbelebten oder biologischen Untersuchungsgut unterscheidet sich prinzipiell vom toxikologisch-analytischen Nachweis einer Alkylphosphatvergiftung. Die analytische Untersuchung will den Nachweis einer stattgefundenen Vergiftung unabhängig davon erbringen, ob zum Zeitpunkt der Untersuchung der ursprüngliche Wirkstoff noch unverändert, bzw. als biologisch wirksamer Metabolit vorhanden ist. Bei der Rückstandsuntersuchung ist dagegen wichtig, ob im Zeitpunkt der Untersuchung die Probe (pflanzliches Material, tierische Organe) noch freien Hemmstoff (residual inhibitor) enthält, der für den Verbraucher schädlich werden kann.

Der Rückstandanalytiker muss sich deshalb einer Methode bedienen, die - anders als die des analysierenden Toxikologenden sicheren Nachweis gestattet, daß kein, bzw. noch freier Wirkstoff in einer Probe enthalten ist.

In sämtlichen chemischen Bestimmungsmethoden für Alkylphosphate wird der Wirkstoff hydrolysiert und der Beweis für sein Vorliegen anhand eines charakteristischen Spalt-

produktes erbracht, z.B. p-Nitrophenol bei Vergiftung durch Parathion (= E 605). Sofern nicht vor der Analyse eine komplizierte wie aufwendige Trennung des unveränderten vom bereits in vivo hydrolysierten Wirkstoffes aufgrund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten in Lösungsmitteln bzw. Wasser - erfolgt, läßt keine derartige Methode eine Unterscheidung zwischen in vivo und (methodisch bedingtem) in vitro-Abbau zu.

Die biologische (Fliegentest) wie enzymatische (Cholinesterasehemmung) Methode erfaßt dagegen nur unveränderte Wirkstoffmoleküle und biologisch aktive Metaboliten. Bei den meisten in vivo auftretenden enzymhemmenden Zwischenprodukten handelt es sich um Oxydationsprodukte der (aus Praxisgründen) als schwefelhaltige Verbindungen (Thionophosphate) formulierten Wirkstoffe (z.B.: Coral-Coroxon; Diazinon-Diazoxon; Malathion-Malaoxon; Parathion-Paraoxon).

Erlaubt die biochemische Methode damit auch keine Differenzierung zwischen noch vorhandenem kompletten Wirkstoff und hemmenden Metaboliten, so wird doch die gesamte aktuelle Toxizität, d.h. der gesamte toxische Rückstand im Zeitpunkt der Untersuchung erfaßt.

Da - heutigem Wissen entsprechend - der Toxizität von Alkylphosphaten allein ihre enzymhemmende Wirkung zugrunde liegt - von dem noch ungeklärten Problem der Neurotoxizität fluorhaltiger Alkylphosphate abgesehen - sind biochemische Nachweismethoden die der Wahl für die Rückstandsermittlung.

Dieser Anspruch erfordert den Nachweis, dass den nicht enzymatisch wirksamen Abbauprodukten der Alkylphosphate keine toxikologische und gesundheitsschädigende Bedeutung zukommt. Diese Tatsache gilt heute - trotz entgegenlautender Befunde von THAMM (1960), die auch im Handbuch der Insektizidkunde (EICHLER, 1965) vertreten werden - als gesichert. THAMM hat die biologischen Methoden der Rückstandsermittlung von Alkylphosphaten grundsätzlich in Frage gestellt, da in seinen Versuchen (auf die später eingegangen wird) mit einem Trichlorphon-haltigen Präparat trotz negativer biologischer Analyse schwere Schäden bei den Versuchstieren auftreten. Verf. folgerte daraus die Unzuverlässigkeit der biochemischen Methoden.

Diese Einschätzung findet keinerlei Bestätigung in der internationalen Literatur zur Rückstandsanalytik organischer Phosphorsäure-Ester, über deren Fortschritte laufend die Serie: Residue reviews (herausgegeben von GUNTHER seit 1962) berichtet. Die Möglichkeit phosphororganische, Esterase-hemmende Verbindungen in einem automatischen Grundarbeitsgang (Analyzer for cholinesterase inhibitors) zu bestimmen, dürfte für künftige Rückstandsuntersuchungen von erstrangiger Bedeutung sein. Das von GUNTHER und OTT (1966) vorgeschlagene System benützt dabei das in vorliegender Arbeit angewandte Prinzip, wonach die enzymaktivitätsabhängige Substratspaltung eines Cholinesters durch den Indikator Phenolrot colorimetrisch angezeigt wird. Dem in vorliegender Arbeit benutzten Verfahren sind prinzipiell ähnlich die Arbeitsvorschriften von GETZ und FRIEDMAN (1963) und MENN und McBAIN (1966). In beiden Fällen

(Tüpfeltest und Dünnschichtchromatographie) wird für die Anzeige der Substratspaltung Bromthymolblau eingesetzt.

Bei all diesen enzymatischen Nachweistmethoden liegen die erfaßten Rückstandsmengen im Bereich zwischen o,1 und 1 ppm bzw. darunter. Damit ist die Empfindlichkeit dieser Methodik ausreichend genau und in Verbindung mit ihrer technisch leichten Durchführbarkeit als sehr brauchbar zu bezeichnen.

MATOUSEK und TOMECEK (1965), die sich ebenfalls dieses Tests - zum Nachweis von Organophosphat-Mengen in Wasser unter einem Mikrogramm - bedienen, geben für Thiophosphate (z.B. Malathion und Parathion) gegenüber den (hochtoxischen) Alkylfluorphosphaten eine bis zu 5 Größenordnungen geringere Empfindlichkeit an.

Damit ist zum Nachweis von Thiophosphaten die Methode erst nach deren Oxydation zum entsprechenden Phosphat ausreichend empfindlich.

Grundsätzlich wird die Zuverlässigkeit der biologisch-enzymatischen Alkylphosphatrückstandsbestimmung davon nicht berührt, da diese Schwierigkeit zu beherrschen ist. Bei der Untersuchung auf Trichlorphon und Dichlorphos besteht dieses Problem nicht und die erzielte Genauigkeit entspricht der in der Literatur angegebenen Größenordnung.

Abschließend ist hier auf die Bedeutung der Inkubationszeit der zu untersuchenden Probe mit dem Enzympräparat hinzuweisen. Aus Untersuchungen von ARTHUR und CASIDA (1957) ist bekannt, daß Cholinesterasen in Anwesenheit eines Substratüberschusses von Acetylcholin von Trichlorphon

nicht gehemmt werden. Bei Inkubation mit Dichlorphos tritt dieser "Schutzeffekt" nicht auf. Die Affinität zu B-Esterasen steigt damit von Trichlorphon über Acetylcholin zu Dichlorphos an.

Praktisch bedeutet dies, dass vor Zusatz des Substrats eine auf Trichlorphon hin zu testende Probe etwa 3o min lang mit dem Enzympräprat zu inkubieren ist, bevor die Aktivität des Ansatzes bestimmt wird. Wird das Substrat früher zugegeben, können zu niedrige Hemmstoffmengen angezeigt werden.

Beim Nachweis von Dichlorphos erübrigt sich diese Maßnahme; es genügt eine Inkubationszeit von maximal 5 Minuten. Längere Inkubationsdauer verändert die gemessene Aktivität nicht. Entsprechend ist die Temperatur, bei welcher der Test durchgeführt wird, bei Dichlorphos praktisch nicht entscheidend.

4.2. Stoffwechsel und Rückstandsverhalten von Trichlorphon und Dichlorphos

4.2.1. Stoffwechsel

In Zusammenfassung der wichtigsten zum Stoffwechsel von Trichlorphon und Dichlorphos vorliegenden Arbeiten - die sich über einen Zeitraum von mehr als lo Jahren erstrecken - läßt sich dazu das folgende Schema aufstellen.

Der Wirkstoff Trichlorphon (1) kann prinzipiell über 2 Abbauwege (I und II) metabolisiert werden.

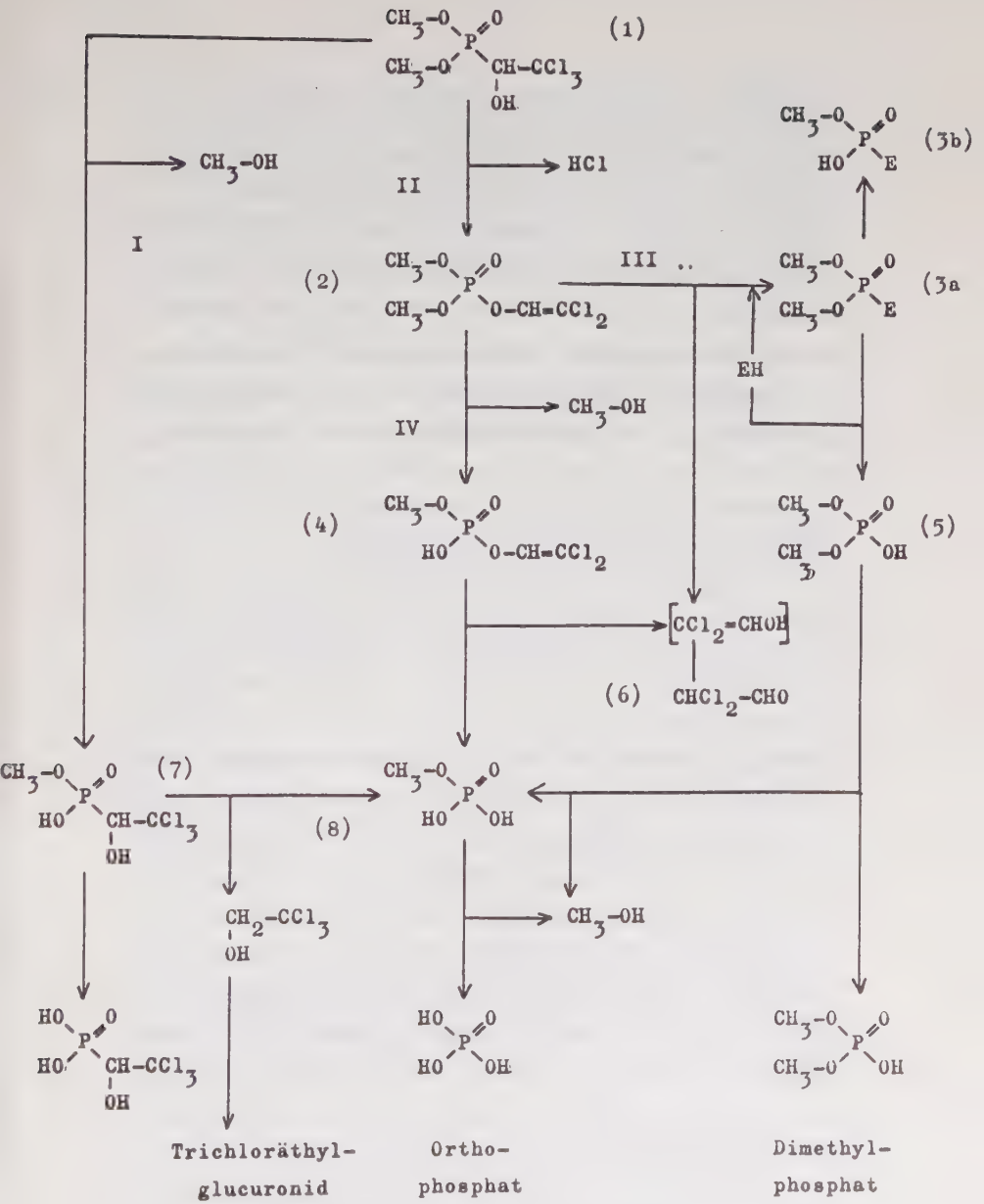


Abb.4.1: Der Stoffwechsel von Trichlorphon und Dichlorphos im tierischen Organismus.
(Erläuterung im Text)

Unter Wasseraufnahme (im schwach sauren Bereich) erfolgt die Abspaltung einer Methylgruppe; (1) geht dabei in das nicht toxische Desmethyl-Trichlorphon (7) über. (7) kann weiterhin die 2. Methylgruppe abspalten und als doppeltdemethyliertes Trichlorphon ausgeschieden werden. Bedeutsamer ist (ARTHUR und CASIDA, 1957) die Spaltung der P-C-Bindung in (7). Das Spaltprodukt Trichloräthanol wird dabei als Trichloräthylglucuronid ausgeschieden; das 2. Spaltprodukt, die Monomethylphosphorsäure (8) gelangt in dieser Form zur Ausscheidung, bzw. wird - nach Abtrennung der Methylgruppe als Orthophosphat-in den Phosphatstoffwechsel des Organismus eingeschleust.

Der für den Wirkungsmechanismus von (1) wichtigere Abbauweg ist II, wobei - im pH-Bereich des Organismus mit etwa 60%iger Ausbeute - unter Abspaltung von Chlorwasserstoff der eigentliche Wirkungsträger Dimethyldichlorvinylphosphat (DDVP, 2) entsteht. Der Weg III gibt die Reaktion der Enzymhemmung wieder, aus welcher der Enzym-Phosphatester (3a) resultiert. Das Reaktionsprodukt (3a) ist im Falle von B-Esterasen - zu denen die Acetylcholinesterase zählt - relativ stabil und zeitigt die typischen Ausfallserscheinungen (endogene Acetylcholinvergiftung). Trifft (2) mit A-Esterasen zusammen, die vor allem in der Leber hochwirksam sind (LAWS, 1966), so resultiert zunächst ebenfalls das Produkt (3a), das in diesem Falle jedoch sofort hydrolytisch gespalten wird. In beiden Fällen (Reaktion mit A- oder B-Esterasen) wird bei der Acylrestübertragung auf das Enzym der Rest des DDVP-Moleküls als Dichlorvinylalkohol abgespalten, der - da unbeständig - in Dichloracetaldehyd (6) übergeht.

Bei der raschen (A-Esterasen) oder langsamen (B-Esterasen) Hydrolyse von (3a) (Enzymreaktivierung) tritt die Dimethylphosphorsäure (5) auf, die entweder in dieser Form ausgeschieden oder partiell weiter gespalten (Demethylierung) als Monomethylphosphorsäure (8) identisch mit der aus Abbauweg I stammenden Verbindung ist.

Gleichzeitig mit den Reaktionen im Abbauweg III verläuft eine Demethylierung von (2) im Abbauweg IV, die Desmethyl-DDVP (4) entstehen läßt, das weiterhin in die Spaltprodukte (8) und (6) zerfällt.

Da die Reaktionen III und IV nebeneinander und gleichzeitig verlaufen, läßt sich nie genau der Prozentsatz des aus (1) entstehenden DDVP angeben, da der größte Anteil sofort in der Leber hydrolysiert wird und sich damit der Bestimmung entzieht.

Auf Grund der vorliegenden Stoffwechseluntersuchungen zu Trichlorphon ist anzunehmen, dass nur 1o-2o% einer Trichlorphondosis - via Dichlorphos - zur Enzymphosphorylierung beitragen (s. auch HEATH 1961).

Als Produkt (3b) ist in dem Schema der "ageing process" angedeutet: Der Übergang des diphosphorylierten Enzyms in die monophosphorylierte Form, die den Übergang des reaktivierbaren Enzyms in die nicht-reaktivierbare Form darstellt. Dabei tritt der entsprechende Alkohol (hier Methanol) aus.

Von sämtlichen in Schema 4.1 gezeigten Verbindungen sind nur Trichlorphon (1) und sein Metabolit DDVP biologisch wirksam und damit von toxikologischer Bedeutung. Dabei kann Trichlorphon als die Depotform von Dichlorphos angesehen werden.

Ein indirekter Beweis für dieses Wirkstoffverhalten von Trichlorphon (Depotform) und Dichlorphos (wirksamer Metabolit) ergibt sich aus folgender Betrachtung:

Aus der LD_{50} eines Alkylphosphates und der im Langzeitversuch mit Tieren ermittelten "annehmbaren Tagesdosis" läßt sich der Quotient

$$\frac{LD_{50}}{\text{annehmbare Tagesdosis}} = K$$

bilden, der als Maß für die Abbaugeschwindigkeit der betreffenden Verbindung gelten kann. Trägt man in einem Koordinatensystem diese Konstante K des einzelnen Wirkstoffes gegen seine LD_{50} auf, so stellt sich der Zusammenhang von Abbaugeschwindigkeit und Toxizität des jeweiligen Alkylphosphats dar.

In Abbildung 4.2 ist diese Beziehung für die folgenden Wirkstoffe graphisch ermittelt:
Für die in der Abbildung gewählten Wirkstoffbezeichnungen ist hier zusätzlich (soweit vorhanden) die freie Bezeichnung angegeben.

Armin
Bromophos
Delnav = Dioxathion
Demeton
Diazinon
Dibrom
Dimethoate
Dipterex = Trichlorphon
Gusathion = Azinphos
Malathion
Metasystox-R = Demeton-O-methylsulfoxyd
Methyl-Paration
Parathion
Thio-Demeton = Disulfoton

Die Werte der peroralen Toxizität bei der Ratte sind bei GAINES (1960) und SCHRADER (1963) entnommen. Die annehmbaren Tagesdosen sind nach der Zusammenstellung in Mitteilung IV (vom 5.4.1965) der Kommission für Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel errechnet, wobei die dort für den Menschen (nach Tierversuchen) angegebenen Werte mit dem Faktor 10 zurückmultipliziert wurden. Die so errechneten Werte können als "annehmbare Tagesdosis" für die Ratte gelten (in mg/kg/Tag).

Aus Abbildung 4.2 läßt sich ablesen, dass die chronische Toxizität mit abnehmender akuter Toxizität anwächst. Umgekehrt nähert sich im Bereich hochtoxischer Alkylphosphate - als deren Vertreter hier Parathion und Armin erscheinen - die annehmbare Tagesdosis dem Wert der LD_{50}. Während die meisten der hier eingezeichneten Verbindungen auf einer Kurve liegen, die durch einen S-förmigen Verlauf charakterisiert ist, steht Trichlorphon (in der Graphik als Dipterex eingetragen) ausserhalb des Kurvenverlaufs. Damit ist die Depotform dieser Verbindung gekennzeichnet, deren wirksamer (toxischer) Metabolit Dichlorphos dann nahe an die S-Kurve zu liegen kommt.

Nach der Phosphorylierungstheorie sind die gebildeten Enzym-Phosphat-Komplexe bei gleiche Alkylgruppen besitzenden Alkylphosphaten identisch. (Die Acyle der Wirkstoffe bestimmen nur die Hydrolysegeschwindigkeit). Damit sind z.B. die von Methyl-Parathion, Trichlorphon und Bromophos gebildeten Enzym-Phosphat-Komplexe völlig gleich. Die toxische Wirkung nach einer Alkylphosphat-

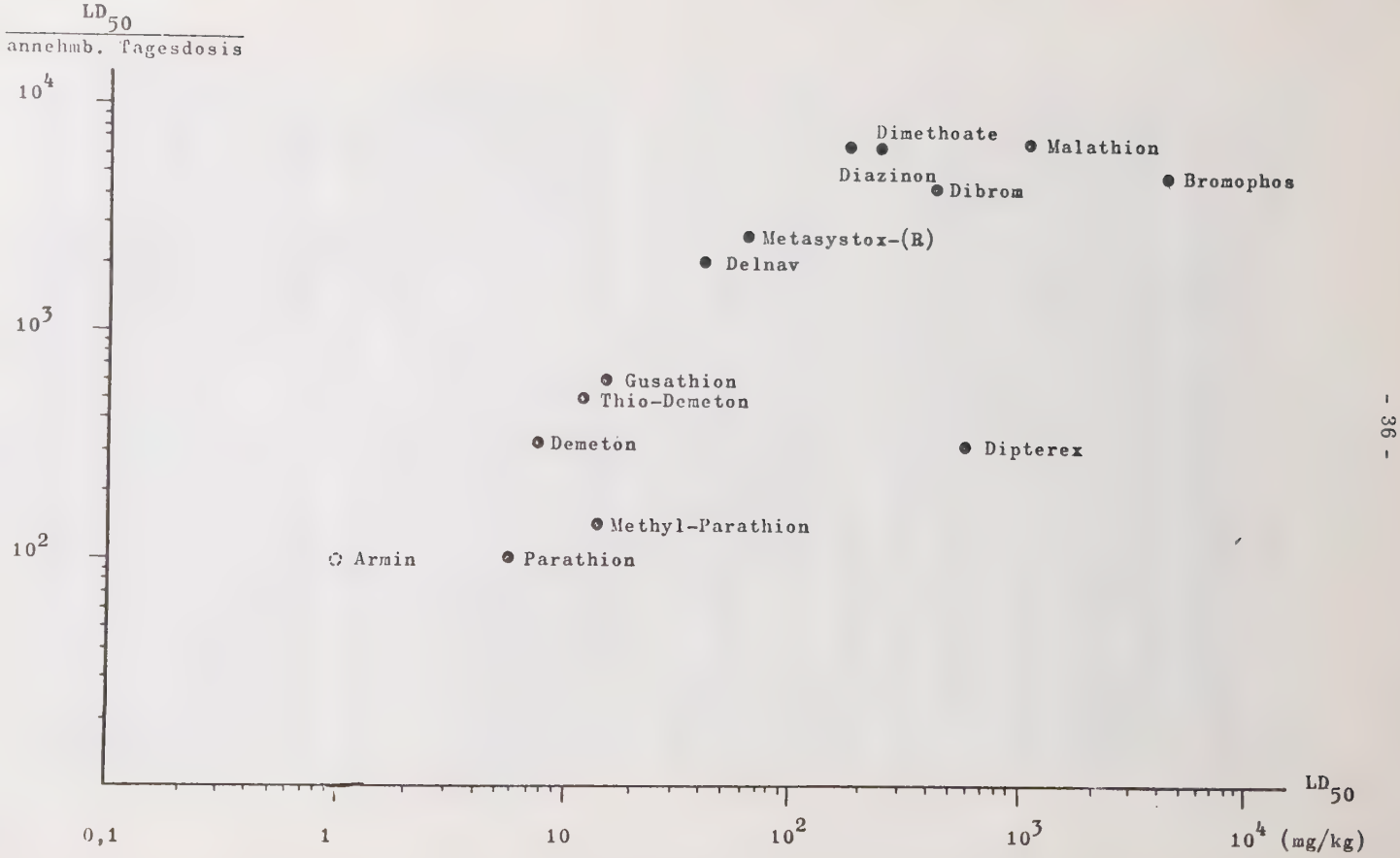

LD50
annehmb. Tagesdosis
10^4
10^3
10^2
Dimethoate
Malathion
Diazinon
Dibrom
Bromophos
Metasystox-(R)
Delnav
Gusathion
Thio-Demeton
Demeton
Dipterex
Methyl-Parathion
Armin
Parathion
LD50
0,1
1
10
10^2
10^3
10^4 (mg/kg)

Abb. 4.2: Beziehung zwischen LD_{50} und annehmbarer Tagesdosis von 14 Alkylphosphaten bei der Ratte.

Abszisse (log): LD_{50} in mg/kg

Ordinate (log): Quotient K $\frac{LD_{50}}{\text{annehmbare Tagesdosis}}$

(Erläuterung im Text)

vergiftung setzt dann ein, wenn die Acetylcholinesteraseaktivität im Organismus auf einen bestimmten Prozentsatz (etwa 2o%) der Normalaktivität abgesunken ist.

Die LD_{5o} ist bei Methyl-Parathion, Trichlorphon und Bromophos jedoch um Größenordnungen verschieden. Damit müssen bei jeder dieser drei Verbindungen verschieden schnelle, bzw. quantitativ unterschiedliche Stoffwechselvorgänge ablaufen, damit dasselbe Wirkungsbild resultiert. Je weiter rechts also in Abbildung 4. 2 eine Substanz im Kurvenverlauf steht, umso größer ist die Verluststrecke (sites of loss), die sie beim Stoffwechsel durchläuft. Je entfernter eine Substanz (rechts) von der Kurve zu liegen kommt, desto sicherer ist sie Depotwirkstoff und wird im Organismus zum aktiven Wirkstoff umgebaut. Trichlorphon zeigt ein in dieser Hinsicht besonders chrakteristisches Verhalten.

4. 2. 2. Rückstandsverhalten

Rückstand ist der Anteil einer vom Organismus aufgenommenen Dosis an Alkylphosphat, der nicht hydrolysiert wird und unverändert im Organismus zurückbleibt.

Der Rückstand an Alkylphosphat setzt sich aus 2 nebeneinander bestimmbaren Fraktionen zusammen. Fraktion (i) ist die nach Giftresorption in den Organen kurzzeitig (bis zu 6 Stunden) nachweisbare Menge, die exponentiell abnimmt und nach diesem Zeitraum den Wert Null erreicht. Fraktion (ii) ist die - äußerst geringe ($\leq$ o, ol ppm) und toxikologisch völlig unbedenkliche - Menge an Alkylphosphat, die - je nach Verbindung - im Zeitraum bis zu 21 Tagen nach der Applikation im Organismus nachweisbar ist und damit in dieser Zeit ausgeschieden wird.

Dieser unverändert im Organismus verbleibende Wirkstoffanteil ist zusammen mit dem den Organismus unverändert passierenden Anteil nicht in Abb. 4.1. eingetragen.

Charakteristisch für das Rückstandsverhalten von Trichlorphon ist die Tatsache, dass der toxische Metabolit Dichlorphos kein Rückstandsproblem aufwirft. Wie ähnliche Metaboliten anderer Alkylphosphate, z.B. Paraoxon aus Parathion, wird auch hier der wirksame Metabolit entsprechend seiner höheren Reaktivität außerordentlich rasch metabolisiert.

ROBBINS, HOPKINS und EDDY (1956), wie ARTHUR und CASIDA (1957) konnten nach Verabreichung von Trichlorphon an Versuchstiere in Organen kein DDVP nachweisen. KÜHNERT, DEDEK und SCHWARZ (1963) gelang der Nachweis nur innerhalb der ersten 4 Minuten nach der Trichlorphoninjektion. In den Versuchen von BEHRENZ (1959) und KEDENBURG (1965) war ein direkter DDVP-Nachweis aus methodischen Gründen nicht möglich. Die eigenen Versuche ergaben, daß DDVP, wenn überhaupt nachweisbar, nur kurze Zeit nach Injektion und an der unteren Grenze der Nachweismöglichkeit zu bestimmen ist.

Nach Trichlorphonbehandlung zeitabhängig feststellbare Wirkstoffrückstände sind damit Rückstände der jeweils noch vorhandenen Menge an Trichlorphon selbst, wobei höchstens Spuren von Dichlorphos in den gefundenen Werten enthalten sind.

Die Untersuchungen von BEHRENZ (1959) sind in dieser Hinsicht am aufschlußreichsten. Danach ist der Höchstwert an Wirkstoff (Trichlorphon) 1 Stunde nach Verabreichung im

Organismus zu finden, wobei in der Muskulatur Werte gefunden wurden, die fast der verabreichten Dosis (in ppm) entsprachen. Es ist anzunehmen, dass bei den Versuchen von BEHRENZ, der den Fliegenlarventest benützte, ein Teil der Larvensterblichkeit auf kurzeitig entstandenes Dichlorphos zurückzuführen ist. Der Wirkstoffgehalt im Fleisch sank anschliessend nach 4-6 Stunden auf biologisch nicht mehr nachweisbare Mengen ab.

BEHRENZ bestätigte damit die älteren Untersuchungen von DU BOIS und COTTER (1955), BOLLE (1956), ROBBINS, HOPKINS und EDDY (1956), und ARTHUR und CASIDA (1957) wonach bei Verabreichung therapeutischer Dosen von Trichlorphon dieses innerhalb weniger Stunden nur noch in Form nicht-toxischer Metaboliten nachweisbar ist: Die 10 min-Blutprobe beim Hund enthält auf 1 Teil Trichlorphon bereits 2 Teile Hydrolysenprodukte. Die Leber ist 15 min nach Applikation wirkstoffrei (s. dazu LAWS, 1966). Nach 3 Stunden ist 1/3 der gesamten Dosis in Form von Abbauprodukten ausgeschieden. Etwa 3% der Hydrolysenprodukte treten in die Faeces über, mehr als 90% erscheinen im Harn, mit dem wiederum ungefähr 3% der Dosis unverändert ausgeschieden werden. Die Ausscheidung der Abbauprodukte dauert 12-24 Stunden. Die Milch hat an der Ausscheidung keinen großen Anteil: innerhalb von 144 Stunden erschienen weniger als 0,2% der gesamten Radioaktivität markierten Trichlorphons darin. Nach BEHRENZ (1961 a) ist das 2. Gemelk nach Behandlung wirkstoffrei. Wie KÜHNERT, DEDEK und SCHWARZ (1963) berichten, ist nach i.v. Trichlorphongabe die Milch nach 6 Stunden frei und enthält nach i.m. Gabe nach 10 Stunden nur noch Spuren an Wirkstoff.

KEDENBURG (1965) findet eine etwas länger andauernde Wirkstoffausscheidung mit der Milch.

In den eigenen Untersuchungen wurde absichtlich der Fall einer Überdosierung gewählt, um den Modellfall einer akzidentellen Vergiftung zu schaffen. Dabei wurde ein Wirkstoffrückstand in Höhe von 4oo ppm in der Muskulatur festgestellt, was 1/4 der verabreichten Dosis entspricht. Mit einer solchen Rückstandsmenge ist in der Praxis nicht zu rechnen, den Fall ausgenommen, bei dem eine Überdosierung rechtzeitig erkannt und durch eine Notschlachtung die Verwertbarkeit des Tierkörpers gesichert wird. Über damit verbundene Maßnahmen wird im nächsten Abschnitt berichtet.

An dieser Stelle ist noch auf die von THAMM (196o) beschriebenen Befunde (s. Abschnitt 2.3) einzugehen. Sie finden sich in keiner der anderen zitierten Arbeiten bestätigt und stellen die einzige anders lautende Beurteilung der hier mitgeteilten Situation dar.

THAMM führte seine Untersuchungen mit dem Präparat Emittol(R) (Chem. Fabr. Delitia, Delitzsch/Sa.) durch, dessen Zusammensetzung wie folgt angegeben ist: 75% von Emittol sind Trichlorphon, der Rest besteht aus einem Körper, der nicht veröffentlicht werden soll und aus inerten Begleitstoffen.

Die von THAMM mitgeteilten histopathologischen Veränderungen finden sich in keiner Arbeit beschrieben und GROB (1963) weist darauf hin, daß postmortale Veränderungen nach Alkylphosphatvergiftungen unspezifisch sind. Gefunden werden mehr oder weniger die Folgen einer cholinergen Übererregung des Organismus.

Mit Recht besteht die Annahme, dass den Befunden von THAMM die Wirkung der unbekannten Anteile der von ihm verwendeten Formulierung zugrunde liegen. Der Wirkstoff Trichlorphon ist dafür nicht verantwortlich zu machen. Die von THAMM gefolgerten Mutmaßungen über die Giftigkeit von Phosphonsäureestern sind in diesem Zusammenhang unrichtig.

Bei der Beurteilung der Rückstände an P-haltigen Metaboliten nach Phosphonsäureester-Applikation im Organismus ist THAMM ein Irrtum unterlaufen. Phosphor- und Phosphonsäureester werden im Organismus bis zu (ungiftigen) Dialkylphosphorsäuren metabolisiert und ausgeschieden, bzw. nach Abbau zum Orthophosphat im Phosphorstoffwechsel des Körpers verwendet (z.B. rascher Einbau von ^{32}P in Knochen). Versuche und Literatur dazu finden sich bei DANGSCHAT (1965). Den vorliegenden Gehalt an Phosphor in Alkylphosphat-Metaboliten beurteilt THAMM jedoch an der Toxizität des elementaren gelben Phosphors.

Es ist anzunehmen, daß in einer Neuauflage der zitierten Monographie diese Fragen überarbeitet werden.

4.3. Notwendigkeit, Möglichkeiten und Verfahren zur Dekontaminierung Trichlorphon-haltigen Fleisches

Wie die Untersuchungen zum Stoffwechsel und Rückstandsverhalten von Trichlorphon und Dichlorphos gezeigt haben, ist von den beiden rückstandsbildenden Fraktionen praktisch nur die zeitabhängige Fraktion von Bedeutung. Damit ist der Zeitraum von der Behandlung an bis zu 6 Stunden danach von Interesse für das Rückstandsproblem. 6 Stunden nach

einer Behandlung kann Fleisch Trichlorphonbehandelter Tiere, wie besonders BEHRENZ (1959) gezeigt hat, als wirkstoffrei gelten. Die zeitunabhängige rückstandsbildende Fraktion ist damit für Trichlorphon nicht relevant.

Innerhalb der zeitabhängigen Rückstandsfraktion ist der Höchstwert innerhalb einer Stunde nach der Giftaufnahme erreicht. Er kann dort nach Angabe von BEHRENZ (1959) bis zu 100 ppm betragen. In den eigenen Versuchen (Modellfall der Notschlachtung nach akzidneteller Vergiftung) wurden 400 ppm Trichlorphon bzw. freier Wirkstoff bestimmt. Innerhalb der folgenden Stunden nimmt der Wirkstoffrückstand sehr rasch ab (etwa um eine Größenordnung pro Stunde).

Unter Normalbedingungen, d.h. bei sachgemäßer Anwendung therapeutischer Dosen bei der Ekto- und Endoparasitenbehandlung ist Muskelfleisch 6 Stunden nach der Behandlung als wirkstoffrei zu bezeichnen. Wirkstoffrei ist hierbei gleichbedeutend mit einem Wert unter der biologischen Nachweisgrenze, die bei 0,1 ppm liegt.

Die annehmbare Tagesdosis für Trichlorphon beim Menschen liegt bei 0,18 mg/kg Körpergewicht bei einer maximal duldbaren Rückstandsmenge von 32 ppm im Verbrauchsgut. Damit liegt ein evtl. Rückstandswert von Trichlorphon im Fleisch 6 Stunden zuvor behandelter Tiere weit unter dem Toleranzwert für den Menschen. Bei Verzehr eines 400 g schweren Fleischstückes nimmt ein erwachsener Mensch (70 kg) - bei Annahme eines Rückstandes von 1 ppm - 0,057 mg/kg Körpergewicht zu sich, was 1/3 der annehmbaren Tagesdosis entspricht. In der Praxis dürfte der tatsächliche Wert darunter liegen.

Damit ist unter Normalbedingungen keine Notwendigkeit für eine Fleischdekontaminierung gegeben.

Eine Möglichkeit stärker Trichlorphon-haltiges Fleisch (z. B. bei Notschlachtung) zu dekontaminieren bietet die Hitzebehandlung des Fleisches.

Diese Möglichkeit ist durch die Flüchtigkeit der Alkylphosphate bei höheren Temperaturen gegeben.

Über die Flüchtigkeit einiger bekannter Alkylphosphate informiert die folgende Abbildung 4. 3., die nach Angaben bei SCHRADER (1963) errechnet ist. Der Wert für Armin ist eigenen Untersuchungen entnommen.

Im Innern von Fleischstücken lassen sich - abhängig von der Dicke der Fleischstücke und der Einwirkungszeit - beim Braten Temperaturen bis zu 85°C und beim Kochen bis zu 93°C erreichen (TILGNER, 1965).

In diesem Temperaturbereich (8o - 9o°C) ist die Flüchtigkeit von Trichlorphon (und Dichlorphos) um ein Mehrfaches größer als eine im Fleisch vorhandene Rückstandsmenge. Nach Untersuchungen von BEHRENZ (1959) läßt sich die Rückstandsmenge im Muskelfleisch durch Kochen des Fleisches auf 1/1oo der Ausgangsmenge reduzieren. In unseren Versuchen genügte eine Kochzeit von maximal 1 1/2 Stunden, um Fleisch mit Rückstandsmengen bis zu 4oo ppm wirkstoffrei zu dekontaminieren (Werte unterhalb der Nachweisgrenze von o,1 ppm).

Bei der Fleischerhitzung wird zusätzlich als 2. Prinzip der Dekontaminierung die direkte Verseifung von Trichlorphon benützt.

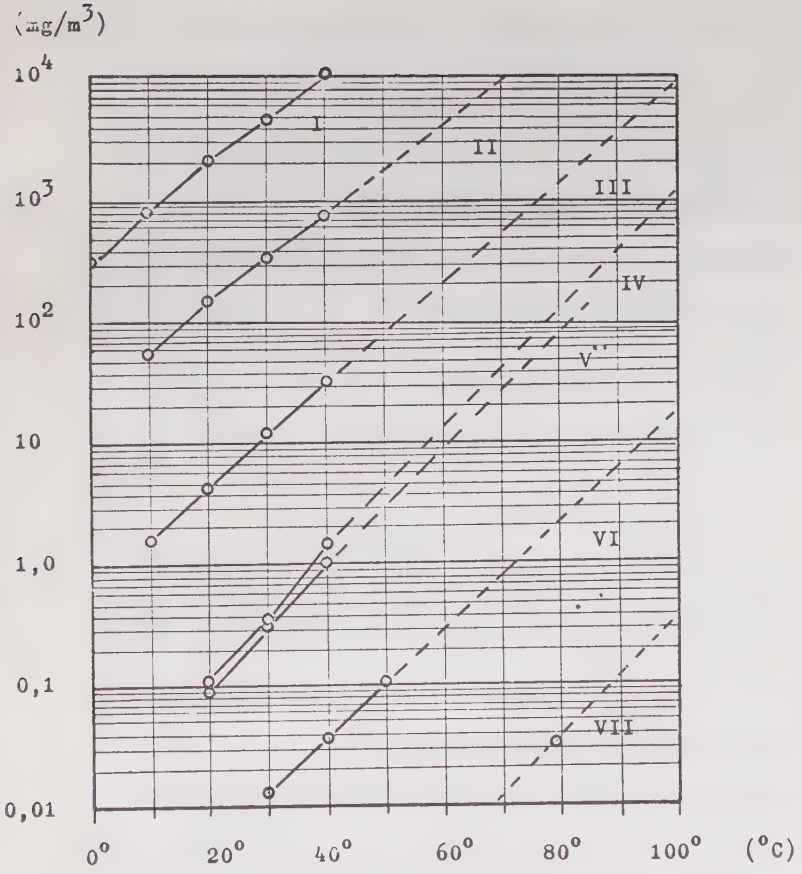


Abb. 4.3.: Die Flüchtigkeit von Alkylphosphaten in Abhängigkeit von der Temperatur
Abszisse: Temperatur in °C
Ordinate: Flüchtigkeit in mg/m^3
I = Diisopropylfluorphosphat (DFP)
II = Dichlorphos
III = Metasystox (i) = Demeton-O-Methyl
IV = Trichlorphon
V = Parathion
VI = Gusathion
VII = Armin

Die Halbwertszeit von Dipterex bei einer Temperatur von 7o°C dauert in Abhängigkeit vom pH-Wert (nach SCHRADER 1963): bei pH 6 = 18o min, pH 7 = 4o min und pH 8 = 36 min.

Damit trägt die hydrolytische Spaltung von Trichlorphon neben dem rein physikalischen Prozeß der Trichlorphon-austreibung zur Dekontaminierung bei.

Einzuhalten ist beim Dekontaminieren eine Kochzeit von mindestens 1 Stunde (im Prinzip bei der küchenmäßigen Zubereitung eingehalten), da - wie die folgende Abbildung 4.4. zeigt - beim Erhitzen von Trichlorphon (bei pH 7) auf 7o°C etwa 6o% des Trichlorphons in das toxischere Dichlorphos übergehen.

Die Umwandlung von Trichlorphon in Dichlorphos ist in Abbildung 4.4. als Anstieg der peroralen LD_{5o} bei der Ratte wiedergegeben, was die Toxizitätszunahme deutlich veranschaulicht. Der Abfall der Toxizität im Verlauf der Kochzeit zeigt an, daß das entstandene Dichlorphos (neben partieller Hydrolyse) ausgetrieben wird.

Beim Kochen mit Trichlorphon stärker kontaminierten Fleisches ist darauf zu achten, daß die entstehenden Dämpfe freien Abzug haben, damit keine Dichlorphosanreicherung im Raume stattfindet. Die MAK von Dichlorphos beträgt 1 mg/m^3 (SAX 1963). Theoretisch wird beim Kochen von loo g mit 4oo ppm Trichlorphon kontaminiertem Fleisch in einem Raum von 25 m^3 dieser MAK-Wert erreicht. Unter praktischen Verhältnissen ist damit kaum zu rechnen.

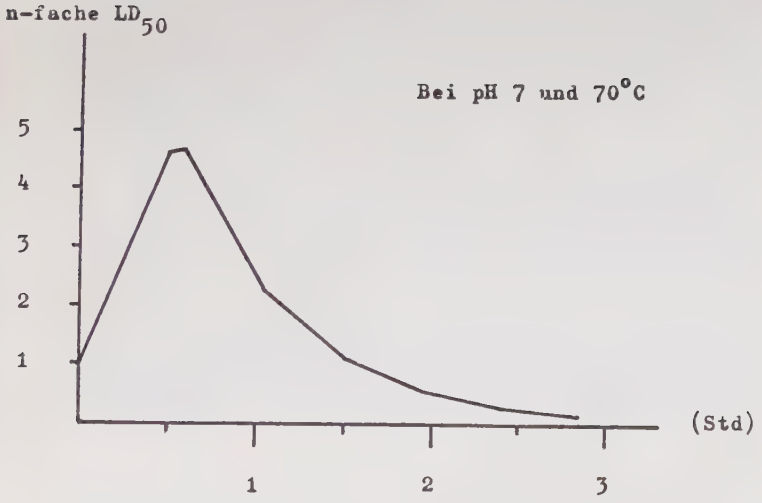


Abb. 4.4: Umwandlung von Trichlorphon in Dichlorphos bei pH 7 und 70°C.

Abszisse: Zeit in Stunden,

Ordinate: Toxizitätszunahme (bestimmt als perorale LD_{50} bei der Ratte) einer wäßrigen Trichlorphonlösung beim partiellen Übergang in Dichlorphos.

4.4. Die fleischbeschauliche Beurteilung des Tierkörpers nach Trichlorphonvergiftung

Bei der Beurteilung alkylphosphathaltigen Fleisches kommt § 34, Abs. 17 der Ausführungsbestimmungen - AB.A - des Fleischbeschaugesetzes in der Fassung vom 15.3.1960 zur Anwendung.

§ 34, Abs. 17

Als untauglich zum Genuß für Menschen sind nur die veränderten Fleischteile (auch Organe und Organteile) anzusehen, das sind ..... die Teile, die bei Vergiftungen ..... das Gift in schädlichen Mengen enthalten können (insbesondere Magen, Darm, Injektionsstellen, Nieren und Euter).

Die Anwendung des § 34 wird sich hier besonders auf die Notschlachtung erstrecken, da unter Normalbedingungen - wie in Abschnitt 4.3 ausgeführt - das Fleisch 6 Stunden nach der Behandlung als genußtauglich gelten kann.

Bei Tieren, die notgeschlachtet werden, wird nach § 27, Abs. 1, Ziff. 1. AB.A die bakteriologische Fleischuntersuchung ausgeführt. Zusätzlich bedingt die Notschlachtung eine Beurteilung nach § 47, Abs. 2, Ziff. 3. AB.A. Danach ist als minderwertig das Fleisch anzusehen bei unvollkommenem Ausbluten, insbesondere bei not- oder krankgeschlachteten Tieren, sofern nicht Veränderungen vorliegen, die eine Beurteilung des Fleisches nach § 32, Abs. 2 AB.A erforderlich machen.

Erfordern Fleischbeschau und bakteriologische Untersuchung keine andere Beurteilung, so ist nach Notschlachtungen wegen Trichlorphonvergiftung das Fleisch als bedingt tauglich zu beurteilen und einer Kochbehandlung zu unterziehen. Die inneren Organe sind entsprechend zu behandeln.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. Untersucht wurden das Rückstandsverhalten von Trichlorphon und Dichlorphos (DDVP) in der Muskulatur.

2. Die Rückstandsbestimmung wurde mittels biologischer Methode (Aktivitätsbestimmung der Cholinesterase) durchgeführt.

3. Nach Verabreichung der 3-fachen LD_{50} von Trichlorphon (Modellfall einer akzidentellen Vergiftung) enthält die Muskulatur bis zu 400 ppm freien Wirkstoff. In Paralleluntersuchungen mit dem Trichlorphonmetaboliten Dichlorphos liegt der Wirkstoffrückstand an der unteren Nachweisgrenze im Bereich zwischen 0,1 und 1 ppm.

4. Diskutiert werden:
   (i) die Brauchbarkeit biologischer Methoden für die Rückstandsbestimmung von Alkylphosphaten
   (ii) Stoffwechsel, Wirkungsmechanismus und Rückstandsverhalten von Trichlorphon und Dichlorphos im tierischen Organismus
   (iii) Notwendigkeit und prinzipielle Möglichkeiten der Fleischdekontaminierung.

5. Trichlorphon- und Dichlorphos-haltiges Fleisch ist durch 1 1/2 stündige Kochbehandlung mit Sicherheit zu dekontaminieren.

6. Die fleischbeschauliche Situation wird erörtert.

LITERATURVERZEICHNIS

ALDRIDGE, W.N.:
Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolyzing p-nitrophenyl acetate, propionate, butyrate and a method of their determination.
Biochem. J. 53, 11o (1953a).

ALDRIDGE, W.N.:
Serum esterases. II. An enzyme hydrolyzing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E6oo) and its identity with the A-esterase of mammalien sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953b).

ARTHUR, B.W. u. J.E. CASIDA:
Metabolism and selectivity of O,O-dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonat and its acetyl and vinyl derivatives.
Agric. Food Chem. 5, 186 (1957).

BEHRENZ, W.:
Biologische Bestimmung des Wirkstoffgehaltes im Fleisch von Schafen und Rindern zu verschiedenen Zeiten nach peroraler Behandlung mit Neguvon.
Arch. Lebensmittelhyg. 1o, 64 (1959).

BEHRENZ, W.:
Über die Ausscheidung von Neguvon(R) in der Milch nach einmaliger oraler und perkutaner Anwendung des Präparates bei Milchkühen.
Vet. med. Nachr. 1961a S. 133.

BEHRENZ, W.:
Biologischer Nachweis von Neguvon(R) in Hühnereiern.
Vet. med. Nachr. 1961b S. 224.

BOLLE, W.R.:
Neguvon, ein äußerlich und innerlich anwendbares Larvizid und Akarizid.
Vet.med.Nachr. 1956, S. 155.

COHEN, J.A. and R.A. OOSTERBAAN:
The active site of acetylcholinesterase and related esterases and its reactivity towards substrates and inhibitors.
In: Handb. Exp.Pharmakol. Erg.Bd.XV, p. 299,
Verlag Springer, Berlin 1963.

DANGSCHAT, H.:
Zur Frage der Rückstände von Alkylphosphaten in der Muskulatur.
Vet.med. Diss. München (1965).

DEUTSCHE FORSCHUNGS-GEMEINSCHAFT:
Kommission für Pflanzenbehandlungs- Pflanzenschutz- und Vorratsschutzmittel. Mitteilung IV, Bad Godesberg (1965) vom 5.4.1965.

DU BOIS, K.P. and G.J. COTTER:
Studies on the toxicity and mechanism of action of dipterex.
Arch. industr. hlth. 11, 53 (1955).

EICHLER, W.:
Handbuch der Insektizidkunde.
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1965).

GAINES, T.B.:
The acute toxicity of pesticides to rat.
Toxicol. appl. pharmacol. 2, 88 (196o).

GETZ, M.E. and S.J.FRIEDMAN:
Organophosphate pesticide residues: a spot test for detecting cholinesterase inhibitors.
J.Amer.off.agric.chem. 46, 7o7 (1963).

GROB, D.:
Anticholinesterase intoxication in man and its treatment.
In: Handb. Exp. Pharmakol. Erg. Bd. XV p. 299,
Springer-Verlag, Berlin 1963.

GUNTHER, F.A. and D.E. OTT:
Automated pesticide analysis and screening.
In: Residue Reviews Vol. 14, p. 12,
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1966).

HASSAN, A., S.M.A.D. ZAYED a. F.M. ABDEL-HAMID:
Metabolism of organophosphorus insecticides.
II. Metabolism of O,O-dimethyl-2,2- trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate (Dipterex) in mammalian nervous tissue and kinetics involed in its reaction with acetylcholine esterase.
Canad. J. Biochem. 43, 1263 (1965a).

HASSAN, A. a. S.M.A.D. ZAYED:
Metabolism of organophosphorus insecticides.
III. Fate of the methyl groups of Dipterex in vivo.
Canad. J. Biochem. 43, 1271 (1965 b).

HEATH, D.F.:
Organophosphorus Poisons.
Pergamon Press, London (1961).

HILGETAG, G. u. H. TEICHMANN:
Über die Alkylierungseigenschaften von Thiophosphorsäure-alkylestern.
Angew. Chem. 77, lool (1965).

HODGSON, E. a. J.E. CASIDA:
Mammalien enzymes involved in the degradation of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate.
Agric. chem. lo, 2o8 (1962).

KEDENBURG, C.P.:
Untersuchungen zur Frage der ernährungshygienischen Unbedenklichkeit des Einsatzes von Ruelene und Neguvon bei der Dasselfliegenbekämpfung.
Vet. med. Diss. München (1965).

KÜHNERT, M., W.DEDEK u. H. SCHWARZ:
Untersuchungen über die Stoffwechselbeeinflußung und den Ausscheidungsmechanismus des Phosphonsäureesters Trichlorphon im Handelspräparat "Bubulin" mit Hilfe von ^{32}-markierten Phosphors bei der intravenösen und intramuskulären Injektion an Rindern.
Arch. exp. Veterinärmed. 17, 4o3 (1963).

LAWS, E.R., jr.:
Route of adsorption of DDVP after oral administration to rats.
Toxicol. apl. Pharmacol. 8, 193 (1966).

LEAHY, J.S.:
Die Bestimmung von Rückständen des Neguvon(R) in der Milch nach dermaler Anwendung beim Rind.
Vet. med. Nachr. 1964, S. 37.

LORENZ, W., A. HENGLEIN a. G. SCHRADER:
The new Insecticide O,O-Dimethyl 2,2,2-Trichloro-1-hydroxy-ethylphosphonate.
J. Amer. Chem. Soc. 77, 2554 (1955).

MATOUSEK, J. u. J. TOMECEC:
Analyse synthetischer Gifte.
Deutscher Militärverlag, Berlin (1965).

MATTSON, A.M., J.T. SPILLANE a. G.W. PEARCHE:
Dimethyl 2,2-dichlorvinyl phosphate (DDVP), an organic phosphorus compound highly toxic to insects.
J. Agric. Food Chem. 3, 319 (1955).

MENN, J.J. a. J.B. McBAIN:
Detection of cholinesterase-inhibiting insecticides, chemicals and pharmaceutical alkaloids on thin-layer chromatograms.
Nature 2o9, 1351 (1966).

PULLMAN, B. a. C. VALDEMORO:
Electronic structure and activity of organophosphorus inhibitors of esterases.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 43, 548 (196o).

ROBBINS, W.E., L. HOPKINS a. W.EDDY:
The metabolism of ^{32}P-labeled Bayer L13/59 in a cow.
J. econ. entom. 49, 801 (1956).

SAX, N.I.:
Dangerous Properties of Industrial Materials.
2nd ed. Reinhold Publ. Co., New York, 1963.

SCHRADER, G.:
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-Ester.
3.Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1963.

THAMM, H.:
Die Bedeutung der Phosphor- und Phosphonsäure-Ester in der Veterinärmedizin vom Standpunkt der Veterinärhygiene.
Veterinäruntersuchungs- und Tiergesundheitsamt Halle a.d.S. Im Selbstverlag, 1960.

TILGNER, D.J.:
Die Technologie des Garverfahrens Braten.
Fleischwirtschaft 45, 301 (1965).

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. K. ZIPF danke ich für die Überlassung des Themas und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem Institut.

Dank schulde ich dem wissenschaftlichen Assistenten, Herrn Dr. G. SCHREIBER für wertvolle Anregungen und für seine Anteilnahme am Gelingen der Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 25. Juli 1936 wurde ich als Sohn des Regierungsbaumeisters Helmut Schenck und seiner Ehefrau Ursula, geb. Beckstroem in Potsdam geboren.

Nach sechsjährigem Volksschulbesuch (in Ostpreußen, Mecklenburg und Bayern) trat ich 1948 in das Alte Gymnasium in Regensburg ein. Nach einer Unterbrechung durch eine zweijährige Baulehre besuchte ich ab 1957 die Oberrealschule in Regensburg und legte dort im Juni 1959 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 196o begann ich an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München das Studium der Veterinärmedizin, das ich im August 1965 mit dem Staatsexamen abschloß. Zur Zeit bin ich als Veterinärpraktikant tätig.